



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**José Jobisvan Leite**

**METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO  
UTILIZADA PELO INSTITUTO DE POLÍCIA CIENTÍFICA DA  
CIDADE DE JOÃO PESSOA, PARA DETECÇÃO DE  
BENZOILECGONINA EM URINA DE INDIVÍDUOS  
VITIMADOS POR ARMAS DE FOGO.**

João Pessoa  
Setembro – 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**José Jobisvan Leite**

**METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO  
UTILIZADA PELO INSTITUTO DE POLÍCIA CIENTÍFICA  
DA CIDADE DE JOÃO PESSOA, PARA DETECÇÃO DE  
BENZOILECGONINA EM URINA DE INDIVÍDUOS  
VITIMADOS POR ARMAS DE FOGO.**

Trabalho de conclusão de curso  
submetido à Coordenação do Curso  
de Farmácia do Centro de Ciências da  
Saúde, da Universidade Federal da  
Paraíba, como parte do requisito final  
para obtenção do título de  
Farmacêutico Generalista.

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães - UFPB  
(Orientador)

João Pessoa  
Setembro – 2013

**METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO UTILIZADA PELO  
INSTITUTO DE POLÍCIA CIENTÍFICA DA CIDADE DE JOÃO PESSOA,  
PARA DETECÇÃO DE BENZOILECGONINA EM URINA DE INDIVÍDUOS  
VITIMADOS POR ARMAS DE FOGO.**

Trabalho de conclusão de curso  
submetido à Coordenação do Curso  
de Farmácia do Centro de Ciências da  
Saúde, da Universidade Federal da  
Paraíba, como parte do requisito final  
para obtenção do título de  
Farmacêutico Generalista.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado em 04 de setembro de 2013, como  
requisito para a obtenção do título de Farmacêutico pela Universidade Federal  
da Paraíba.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães - UFPB  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Ticiano Pereira Barbosa - IPC-PB/SEDS  
(Examinador)

---

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos - UFPB  
(Examinador)

João Pessoa  
Setembro – 2013

## LISTA DE ABREVIATURAS

(COC) – Cocaína

(COHCl) – Cloridrato de cocaína

(COC-base) – Cocaína na forma de base livre

( $t_{1/2}$ ) – Tempo de meia vida plasmática

(EME) – Estermetilecgonina

(BE) – Benzoilecgonina

( $H_2NCH_3$ ) – Metilamina

(SNC) – Sistema nervoso central

(DA) – Dopamina

(nm) – Nanômetro

(ng) – Nanograma

( $\mu$ L) – Micro litro

( $\mu$ g) – Micrograma

(MG) – Miligrama

( $\mu$ m) – Micrômetro

(mm) – Milímetro

(cm) – Centímetros

(g) – Grama

(mL) - Mililitro

(CLAE) – Cromatografia líquida de alta eficiência

(IPC) – Instituto de polícia científica

(NaHCO<sub>3</sub>) – Bicarbonato de sódio

(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) – Dihidrogenofosfato de potássio

(pH) – Potencial hidrogeniônico

(DAD) – Detector de arranjo de Diodos

(NH<sub>4</sub>OH) - Hidróxido de amônio

(M) – Molar

(rpm) - Rotações por minutos

(v/v) – Volume/volume

(ACN) – Acetonitrila

(PAD) – Padrão

(ppm) – Partes por milhão

(Ed) – Edição

(UV-Vis) – Ultravioleta-visível

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 01** - Estrutura molecular da cocaína.....10

**Figura 02** – Produtos de biotransformação da cocaína.....12

**LISTA DE QUADRO**

<b>Quadro 1</b> – Alguns usos da cocaína ao longo da história.....	9
--	---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1 Considerações Iniciais.....	13
1.2 Cocaína – Aspectos gerais sobre o abuso de drogas.....	13
1.3 Aspectos toxicocinéticos e toxicodinâmicos da cocaína e derivados.....	15
1.4 Aspectos analíticos da cocaína e derivados.....	16
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>20</b>
1.5 Gerais.....	20
1.6 Específicos.....	20
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 Amostra e materiais utilizados.....	21
3.2 Equipamentos Utilizados.....	21
3.3 Procedimentos Pré-analíticos.....	21
3.3.1 Técnica Extrativa.....	22
3.4 Procedimentos analíticos para identificação e quantificação.....	22
3.4.1 Imunoensaio.....	22
3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	22
3.4 Análises experimentais para qualificação do método.....	24
3.5 Fluxograma para análise de urina.....	25
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>



4.1 Testes de triagem por imunoensaio.....	26
4.2 Testes de confirmação da presença de benzoilecgonina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).....	26
4.2.1 Seleção da fase móvel.....	26
4.2.2 Seleção do comprimento de onda.....	26
4.2.3 Cromatogramas.....	27
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>34</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## RESUMO

O presente estudo apresenta e qualifica a metodologia usada pelo Instituto de Polícia Científica (IPC) da cidade de João Pessoa, para extração e identificação de benzoilecgonina (BE), o principal metabólito da cocaína, em urina de indivíduos vitimados por armas de fogo. Essa metodologia está baseada em duas fases, a primeira é um teste de triagem por imunoensaio e a segunda é a confirmação da presença do metabólito na urina através de uma técnica de confirmação, a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Estas técnicas são utilizadas para verificar se o indivíduo morto por armas de fogo é usuário de cocaína tanto na forma de cloridrato (pó cristalina) como na forma de base livre (crack), para uma possível relação da causa morte com o envolvimento com drogas de abuso. De acordo com os resultados obtidos, esta metodologia apresentou uma excelente eficiência, tanto no teste de triagem quanto no teste confirmatório. No teste de triagem por imunoensaio conseguimos detectar a presença de benzoilecgonina em todas as amostras contaminadas com o principal metabólito da cocaína. No teste de confirmação por CLAE usando uma fase móvel na proporção de 63:37 (v/v) de tampão fosfato: acetonitrila em um pH de 2,3 possibilitou um sinal de pico em um tempo de retenção de 3,467 min em todas as amostras contaminadas. O sinal espectrofotométrico otimizado foi obtido em um comprimento de onda de 224 nm. Obtivemos também em um intervalo de 195 a 350 nm uma pureza de pico para a amostra de 1 µg/mL de 0,8661, a de 5 µg/mL foi de 0,9183, para as concentrações de 10, 20, 40 e 80 µg/mL as purezas dos picos foram de 0,9178; 0,8882; 0,8471 e 0,8048 respectivamente. Essas amostras de urina eram todas pré-analisadas pelo imunoensaio e tomadas como resultado negativo para presença de BE. Elas foram cedidas para estudo pelo IPC do município de João Pessoa-PB.

### Palavras chave:

1. Metodologia de extração - identificação e IPC – João Pessoa.
2. Detecção de benzoilecgonina na urina.

## ABSTRACT

This study introduces and describes the methodology used by forensic institute (IPC) of the city of João Pessoa, extraction and identification of benzoylecgonine (BE), the major metabolite of cocaine in urine of individuals victimized by firearms. This method is based on two phases, the first test is a screening immunoassay and the second is to confirm the presence of the metabolite in the urine over a confirmation technique, the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). These techniques are used to verify that the dead individual firearm user is either in the form of cocaine hydrochloride (crystalline powder) as the free base (crack) for a possible relation to the cause of death engagement with drug abuse. According to the results, this method was an excellent efficiency, both in the screening test as confirmatory test. In the immunoassay screening test can detect the presence of benzoylecgonine in all samples infected with the principal metabolite of cocaine. In confirmation test by HPLC using a mobile phase at a ratio of 63:37 (v / v) phosphate buffer: acetonitrile at pH 2.3 made possible a signal peak at a retention time of 3.467 min for all samples contaminated. The spectrophotometric signal was obtained in an optimized wavelength of 224 nm. We have also obtained in a range from 195 to 350 nm peak purity of the sample 1 mg / ml of 0.8661 to 5 mg/mL was 0.9183, at the concentrations of 10, 20, 40 and 80 mg/mL purity of the peaks were 0.9178, 0.8882, 0.8471 and 0.8048 respectively. These urine samples were all pre-analyzed by immunoassay and taken as negative for the presence of BE. They were assigned to study the CPI in the city of João Pessoa-PB.

# 1INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Iniciais

O envolvimento humano com substâncias psicoativas, em especial a cocaína, retorna a um passado longínquo (CHASIN; LIMA, 2008). O uso de cocaína tem suas raízes nas grandes civilizações pré-colombianas dos Andes que, há mais de 4500 anos (Quadro 01), já conheciam e utilizavam a folha extraída da planta *Erytroxylum coca* ou coca boliviana, como testemunham as escavações arqueológicas do Peru e da Bolívia (JANICKA; KOT-WASIK; NAMIES NIK, 2010).

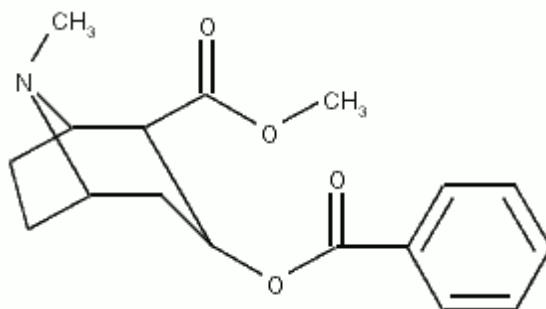
**Quadro 1** – Alguns usos da cocaína ao longo da história

Período	Usos	Referências
4.500 AC	Rituais de fertilidade; Práticas curativas;	FERREIRA; MARTINI, 2001
Final do Século XVI	Introduzida na Espanha pelos conquistadores para fins medicinais e afrodisíacos.	FERREIRA; MARTINI, 2001 SILVA et al., 2010
1859	Albert Niemann isola vários alcaloides do extrato da planta	BAHLS; BAHLS, 2002 CHASIN; LIMA, 2008 SILVA et al., 2010
1902	Willstatt (prêmio Nobel) produz cocaína sintética em laboratório - Sob a forma de cloridrato de cocaína	FERREIRA; MARTINI, 2001 SILVA et al., 2010
Anos 1920	Introdução das seringas hipodérmicas e primeiros casos de intoxicação por cocaína intravenosa	KARCH, 1999 SILVA et al., 2010
Anos 1980	No Brasil ocorre o surgimento da cocaína no mercado negro	SILVA et al., 2010
1991	Primeiro relato da apreensão de crack ocorrido no Brasil (cidade de São Paulo)	OLIVEIRA; NAPPO, 2008

## 1.2 Cocaína – Aspectos gerais sobre o abuso de drogas

A cocaína (COC – Figura 01) é um dos alcalóides presentes nas folhas provenientes de duas espécies do gênero *Erytroxylum*, vulgarmente denominadas coca: a *Erytroxylum novogranatense*, variedade trujillo cultivada legalmente e cuja produção destina-se à indústria farmacêutica, onde a cocaína é utilizada como anestésico local ou à indústria alimentícia, como constituinte de chás, e a *Erytroxylum coca*, que constitui a principal fonte da produção da droga ilícita (BAHLS; BAHLS, 2002; SILVA *et al.*, 2010).

**Figura 01** - Estrutura molecular da cocaína- (3-benzoiloxi-8-metil-8-azabicyclo. [3.2.1] octano-4-carboxílico) (OLIVEIRA *et al.*, 2009).



A cocaína ilícita é mais frequentemente encontrada na forma de pó cristalino, cloridrato de cocaína (COCHCl), com ponto de fusão em torno de 197°C, obtido através do tratamento da pasta de coca purificada com ácido clorídrico, onde é auto administrada por aspiração nasal, por via oral ou intravenosa, sendo bem absorvida na através da mucosa nasal (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2008).

Além disso, o princípio ativo da planta extraído na forma de base livre (COC-base) apresenta baixo ponto de fusão (96 a 98 °C); volatiliza-se a aproximadamente 90 °C e, quando aquecida, permite que seus vapores sejam inalados no ato de fumar (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O crack é uma das formas ilícitas comercializadas, preparado através do aquecimento da solução aquosa do cloridrato com substâncias básicas,

geralmente bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O uso abusivo de cocaína tem se constituído um problema cada vez maior na sociedade. As complicações neuropsiquiátricas e cardiocirculatórias, assim como os transtornos sócios ocupacionais, econômicos e legais associados ao abuso fazem com que esse fenômeno necessite ser cada vez mais estudado (OLIVEIRA; NAPPO, 2008). O aumento das taxas de morbidade e mortalidade ocorre devido a uma diminuição no preço da droga e um aumento da sua disponibilidade, onde uns maiores números de pessoas utilizam a droga em concentrações e doses cada vez mais elevadas, segundo FERREIRA; MARTINI, 2001; OLIVEIRA; NAPPO, 2008 esses dados nunca tinham sido relatados no passado (FERREIRA; MARTINI, 2001; OLIVEIRA; NAPPO, 2008).

Dados levantados pelo Informe Mundial sobre Drogas de 2013 mostram que a cocaína/crack é considerada a segunda droga-problema mais comum no mundo e a principal das Américas, onde as estimativas do referido informe indicam que o seu consumo afeta mais que 14 milhões de pessoas em todo o mundo, com idade entre 15 e 64 anos, sendo predominante entre jovens dos 20 aos 29 anos; Além disso, o consumo de cocaína produz um grande impacto na saúde pública e, portanto, tem sido frequentemente o alvo de diversos estudos científicos em todo o mundo (CUNHA *et al.*, 2004; UNODC; 2013).

No Brasil, levantamentos epidemiológicos têm apontado o aumento do uso de crack, possivelmente em razão de mudanças de seu acesso, estratégias de mercado e formas de uso, sendo o consumo da substância no Brasil, um problema de saúde que deve preocupar e mobilizar todos os profissionais e a sociedade em geral (GALDURÓZ *et al.*, 2004; OLIVEIRA; NAPPO, 2008).

### **1.3 Aspectos Toxicocinéticos e Toxicodinâmicos da cocaína e derivados**

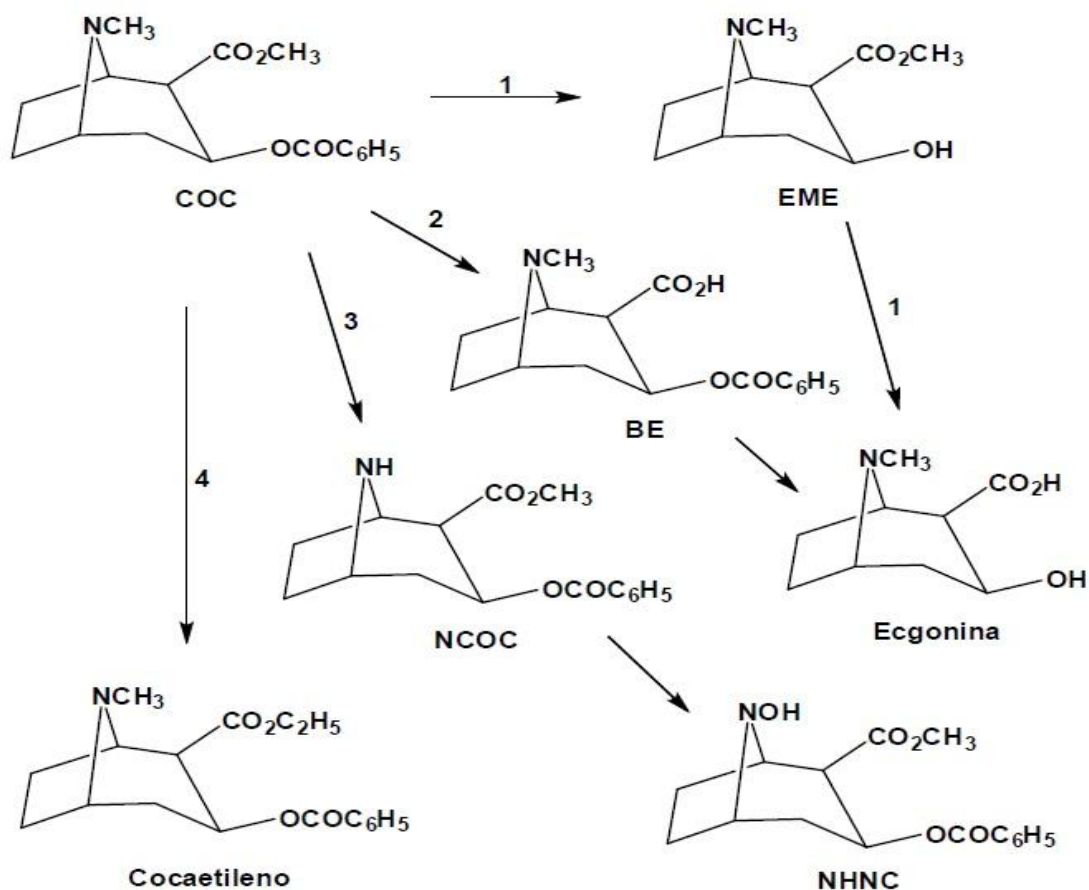
O sal extraído das folhas de *Erythroxylum coca*, na forma de cloridrato, pode ser absorvido rapidamente, quando aspirado, pela mucosa nasal e atinge

a circulação sanguínea chegando até o SNC, produzindo intensa euforia; tem meia vida plasmática ( $t_{1/2}$ ) curta, em torno de 30 a 90 min (WARNER, 1993; BOGHDADI; HENNING, 1997).

A administração por via inalatória da cocaína na forma de base livre, ou seja, fumada, em termos de pico de concentração plasmática, duração e intensidade de efeitos podem ser comparadas qualitativamente a via intravenosa. Nessa forma ela tem uma biodisponibilidade de aproximadamente 60 a 80% (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2008).

A biotransformação do alcalóide propicia a formação de uma série de metabólitos (Figura 02) como Benzoilecgonina (15 a 50%), éster metilecgonina (15 a 35%), ecgonina (1 a 8%), norcocaína (2 a 6%) e na forma precursora cocaína (3%) (Silva, O.A; ODO, S.A., 1999).

**Figura - 02-** Produtos de biotransformação da cocaína. 1 (colinesterases); 2 (carboxiesterases); 3 (citocromo P-450); 4 (etil transesterificação); EME (éster de metilecgonina); BE (benzoilecgonina); NCOC (norcocaína); NHNC (n-hidroxicocaína). (Adaptado de CHASIN *et al.*, 2008).



A cocaína é excretada na urina na forma inalterada em quantidades bem reduzida. Isso se dá devido a suas características físico-químicas e seu processo de metabolização no organismo (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2008).

O estudo toxicodinâmico da cocaína de mostra como provável mecanismo de ação no SNC o bloqueio da receptação da dopamina (DA) e de noradrenalina (NA) nas fendas sinápticas, que parece ocorrer devido à ligação da cocaína aos sítios transportadores de dopamina, onde o acúmulo de dopamina nos receptores pós-sinápticos D1 e D2 parece ser o mecanismo fisiopatológico pelo qual ocorre a euforia (SILVA et al., 2010).

O uso frequentemente por bastante tempo de cocaína pode trazer alguns efeitos indesejáveis ao organismo como a hipertrofia ventricular esquerda, a cardiomiopatia dilatada, a aterosclerose, a disritmias crônicas e a apoptose do cardiomiócito, dentre outras complicações (BOGHDADI; HENNING, 1997).

#### **1.4 Aspectos analíticos da cocaína e derivados**

A metodologia analítica para identificação e quantificação de cocaína e seus produtos de biotransformação vem sofrendo um rápido avanço. Da década de 70 aos dias atuais as técnicas analíticas vêm sendo otimizadas para suprir as novas necessidades da investigação científica relacionadas ao conhecimento dos aspectos toxicológicos (CHASIN *et al.*, 2008).

As análises toxicológicas, na área forense, são empregadas com o intuito de orientação de procedimentos judiciais, sendo desenvolvidas com a finalidade de estabelecer nexos causais entre o agente químico (toxicante) e a morte ou dano infligido ao homem. (KLAASSEN, 2012).

Para que o diagnóstico toxicológico seja confiável, faz-se necessário a realização de uma análise toxicológica eficiente. Primeiramente é realizada uma triagem, por métodos gerais, principalmente quando não se conhece o agente tóxico a pesquisar (MOREAU; SIQUEIRA, 2008).



Estes métodos são empregados para verificar a ausência ou a presença de uma determinada classe ou grupo de substâncias, onde a importância da escolha de um método de triagem é fundamental, pois define a variedade de analitos que serão procurados e detectados. Portanto, deverá ter sensibilidade, eficiência e abrangência de compostos para ser considerado adequado (DRUMMER, 2007; BULCÃO *et al.*, 2012; MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

Do ponto de vista ético, resultados obtidos a partir de técnicas de triagem não podem ser considerados definitivos, devendo-se realizar métodos confirmatórios (MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

Nas entrevistas realizadas com peritos químicos legais do IPC de João Pessoa, foi relatado que em um indivíduo vitimado por arma de fogo, há uma coleta da urina, onde posteriormente são realizados procedimentos extrativos para se identificar a presença de drogas, a maconha (principal metabólito: 11-nor-9-carboxi-Tetrahydrocannabinol) e cocaína (principal metabólito benzoilecgonina), por conta de serem encontradas em maior quantidade na cidade de João Pessoa e serem mais utilizadas pelos usuários. Essa pesquisa de drogas na urina se dá para auxiliar a polícia a identificar a causa da morte, esclarecendo algumas suspeitas e/ou relacionar com o envolvimento e/ou tráfico de drogas.

A pesquisa para determinação de cocaína e de seu principal metabólito na urina de indivíduos mortos por armas de fogo inicia-se com a coleta da urina pelo médico legista e é enviada para o setor de amostras biológicas do laboratório de toxicologia, onde o primeiro passo é o um teste por imunoensaio cromatográfico rápido, em tira, para detecção do metabólito da cocaína, a benzoilecgonina. Para detecção da cocaína em indivíduos que usam eventualmente, a BE pode ser detectada em torno de 3 dias após seu último uso. Já no caso de indivíduos que faz uso frequente pode-se detectar a droga na urina em torno de 7 dias após seu último uso (DEL-CAMPO, 2008).

O teste por imunoensaio para cocaína é um teste de triagem rápido, sem a necessidade de equipamentos. O teste utiliza anticorpos monoclonais para

detectar, de forma seletiva, os níveis elevados de metabolitos da cocaína na urina. Esse teste é capaz de detectar até 300 ng/mL de metabolitos da cocaína na urina que é o valor de *cut-off* sugerido, pelo National Institute on Drug Abuse, para as amostras positivas (Hawks, RL, CN Chiang, 1986).

O teste por imunoensaio é baseado na ligação competitiva pelos anticorpos entre a droga conjugada imobilizada sobre a membrana e a droga ou seu metabolito que possa está presente na amostra de urina. A tira reativa tem a droga conjugada imobilizada na área do teste e anticorpos conjugados ao ouro coloidal na membrana conjugada (marcada com o cromógeno, que por sua vez é a substância que irá promover a coloração) (HAWKS; CHIANG, 1986).

Durante a análise, uma amostra de urina migra através da ação da capilaridade. A benzoilecgonina se estiver na amostra de urina abaixo de 300 ng/mL, não saturará os sítios de ligação dos anticorpos conjugados ao ouro na tira reativa marcada com o cromógeno. Os anticorpos conjugados ao ouro marcado com o cromógeno serão capturado pelo conjugado da droga imobilizado na área teste da tira reativa e aparecerá uma linha vermelha. Se o nível de benzoilecgonina for superior a 300 ng/mL saturando todos os sítios de ligações dos anticorpos conjugados ao ouro marcado com o cromógeno. Portanto, uma amostra de urina positiva não formará uma linha vermelha na área teste por causa da competição da droga, enquanto que um resultado negativo da amostra de urina formará uma linha na área teste por causa da ausência de competição da droga (HAWKS; CHIANG, 1986).

Independente da presença da benzoilecgonina, uma linha vermelha na área controle sempre aparecerá. A presença desta linha serve como verificação de volume suficiente de amostra, de fluxo apropriado e como um controle para os reagentes (HAWKS; CHIANG, 1986).

O teste apresenta resultado qualitativo, e, portanto não se pode quantificar concentrações da droga na urina nem o nível de intoxicação, o resultado é utilizado somente para urina sem adulteração, os adulterados

podem produzir erros no resultado e os erros de procedimento ou técnico também podem causar erros nos resultados (HAWKS; CHIANG, 1986).

O imunoensaio fornece apenas um resultado analítico preliminar. Para confirmação do resultado é utilizado uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica que possibilita as análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Tem sido utilizada em várias áreas da ciência. As separações em CLAE podem se dá por adsorção, partição ou ambos os meios. A versatilidade dessa técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza e estarem livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e degaseificadas antes do uso, além disso, a bomba deve proporcionar ao sistema, uma vazão contínua sem pulsos e com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequadamente. As válvulas de injeção usadas possuem uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, uma para o preenchimento da alça e outra para sua liberação para a coluna. As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para separações preparativas. Em comprimento as colunas variam de 10 a 30 cm, e essas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução. O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta. O registro de dados pode ser feito através de um registrador, um integrador ou um microcomputador (VOGEL *et al.* 2005.).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Gerais**

Apresentar a metodologia de extração e identificação da benzoilecgonina (metabólito da cocaína) em urina de indivíduos mortos por armas de fogo, realizada pelo instituto de polícia científica do município de João Pessoa.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar os principais procedimentos na coleta de matriz biológica utilizada no Laboratório de Toxicologia do IPC, para posterior identificação da droga de abuso e/ou seus metabolitos em casos de homicídio ocorridos na cidade de João Pessoa;
- Identificar os principais procedimentos relacionados ao processo de extração de amostras para posterior identificação de cocaína e seus metabolitos;
- Apresentar os principais métodos de identificação de cocaína e seus metabolitos utilizados no Laboratório de Toxicologia Analítica do IPC;
- Fornecer informações que colaborem no desenvolvimento de políticas de segurança pública.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostra e materiais utilizados**

No imunoensaio foram utilizados tiras reativas da indústria Inlab Diagnóstica, coletores universais e as amostras de urina.

Na fase de extração foram utilizados 5 mL de urina, hidróxido de amônio a 0,5 molar, 100 mg bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), 15 mL do solvente extrator diclorometano: isopropanol na proporção de 3:1 e sulfato de sódio anidro.

Na preparação da fase móvel usou-se como amostra o extrato de urinas, e como reagentes foi acetonitrila, ácido fosfórico, fosfato e dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

Outros materiais também foram usados como tubo Falcon de 50 mL, pipetas automáticas, papéis reativos de potencial hidrogeniônico (pH), funil, papel de filtro, béquer, contador de gotas, seringa, balões de 10 mL e filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### **3.2 Equipamentos Utilizados**

Centrífuga, balança analítica, banho de ultrassom, geladeira e cromatógrafo.

#### **3.3 Procedimentos Pré-Analíticos**

As amostras de urina bem como o padrão purificado do benzoilecgonina foram fornecidas pelo instituto de polícia Científica da cidade de João Pessoa. O padrão utilizado foi uma amostra da benzoilecgonina em uma concentração de 1 mg/mL.

O solvente orgânico utilizado na fase móvel cromatográfica foi Acetonitrila do fabricante Merck padrão CLAE. Para a composição aquosa desta fase móvel, utilizou-se água deionizada.

O procedimento experimental de extração e identificação da benzoilecgonina na urina de indivíduos mortos por armas de fogo inicia-se com a chegada da urina no setor de extração. Ela vem em um coletor universal.

### 3.3.1 Técnica Extrativa

Em um tubo Falcon de 50 mL identificado colou-se 5 mL de urina a temperatura ambiente, ajustou-se o pH com hidróxido de amônio a 0,5 molar ( $\text{NH}_4\text{OH}$  0,5 M) até 8,0 (o pH mais alto pode hidrolisar a cocaína e a benzoilecgonina), foram adicionados aproximadamente 100 mg de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) para o “*salting out*”, 15 a 20 mL do solvente extrator (diclorometano: isopropanol (3:1)), fechou-se o tubo e homogeneizar lentamente por 15 min. Após a homogeneização levou-se a centrifuga em 2000 rpm por 10 min, coletou-se a fase orgânica (inferior) com auxílio de pipeta e o filtrou sobre sulfato de sódio anidro (pouco) para um béquer identificado, aguardou-se a evaporação do solvente orgânico e enviou o extrato para análise por CLAE (KISZKA; MADRO, 2001).

## 3.4 Procedimentos analíticos para identificação e quantificação

### 3.4.1 Teste de triagem por Imunoensaio

Antes da análise, para um bom resultado do teste de triagem por imunoensaio, a tira e a amostra de urina devem estar em temperatura ambiente, em torno de 20-30 °C. Desta forma colocou-se a tira verticalmente dentro do balão de 10 mL com urina, sem ultrapassar a marca do nível máximo indicado pela seta. Deixando-a dentro do balão por 5 segundos, para que haja a absorção de urina pela tira e aguardou-se 5 min para ler os resultados (HAWKS; CHIANG, 1986).

### 3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

A fase móvel foi preparada em uma proporção 63:37 (v/v) de tampão fosfato: acetonitrila em pH 2,3. Para preparação da fase móvel foram dissolvidos 1,4 g de dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em 1000 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , adicionou gotas de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) até ajustar o pH para aproximadamente 2,3 e colocou-se por 20 min no banho de ultrassom para eliminar as bolhas (PRAGST *et al.*, 2004).

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a líquido de alta eficiência, Scientific® modelo Surveyor®, com injetor automático, modelo Thermo Scientific® Surveyor Auto sampler Plus®, detector de arranjo de diodos, modelo Thermo Scientific® PDA Plus® e acoplado a computador munido de software de aquisição e tratamento de dados Chrom Quest® versão 5.0 e biblioteca de espectros de UV/Vis UV Tox® (PRAGST *et al.* 2004).

O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min em modo isocrático, com um tempo total de análise 10 min, tendo também a coluna cromatográfica de fase reversa C<sub>8</sub> (25 cm x 4.6 mm id x 5µm) Ace® e pré-coluna C<sub>8</sub> Ace®, a temperatura do forno da coluna foi 30 °C, o volume de injeção foi 10 µL, um detector possuindo uma absorção em um comprimento de onda de 224 nm com arranjo diodos (DAD) de 195 a 350 nm, onde o tempo de retenção estimado do padrão foi de 3,2 min (PRAGST *et al.* 2004).

Na preparação da amostra, antes da análise, armazenou-se o béquer sob congelamento (-20 °C). Logo antes da análise, adicionou-se 500 µL da fase móvel, para resuspensão do metabolito da cocaína, a benzoilecgonina, no béquer da amostra e foi realizado processo de filtragem usando seringa e filtro de 0,45 µm para análise no CLAE.

Para melhor desempenho da CLAE, propiciando resultados mais precisos, exatos e satisfatórios, e, também, para evitar danos ao aparelho que poderão causar mau funcionamento posteriormente. Devem-se fazer alguns procedimentos como o revezamento da linha para evitar corrosão, de alterar a linha no método da CLAE, sempre a purga da linha deve estar selecionado para 3 min, acondicionar o sistema por 20 min antes da análise do padrão (id: PADRÃO BEC TICI <D>), executar o salvamento dos arquivos, adicionar o método Shutdown, quando se fazer as sequências, cálculo e preparo da quantidade de fase móvel suficiente para todas as corridas + purga + condicionamento + padrão + 150 mL restantes finais, realizar a limpeza do sistema após finalizar as análises com método de limpeza (purga de 3 min com a solução de H<sub>2</sub>O: ACN (50:50 v/v) e 10 min de download método antes de *Take off*) (PRAGST *et al.* 2004).

### **3.4 Análises experimentais para qualificação do método**

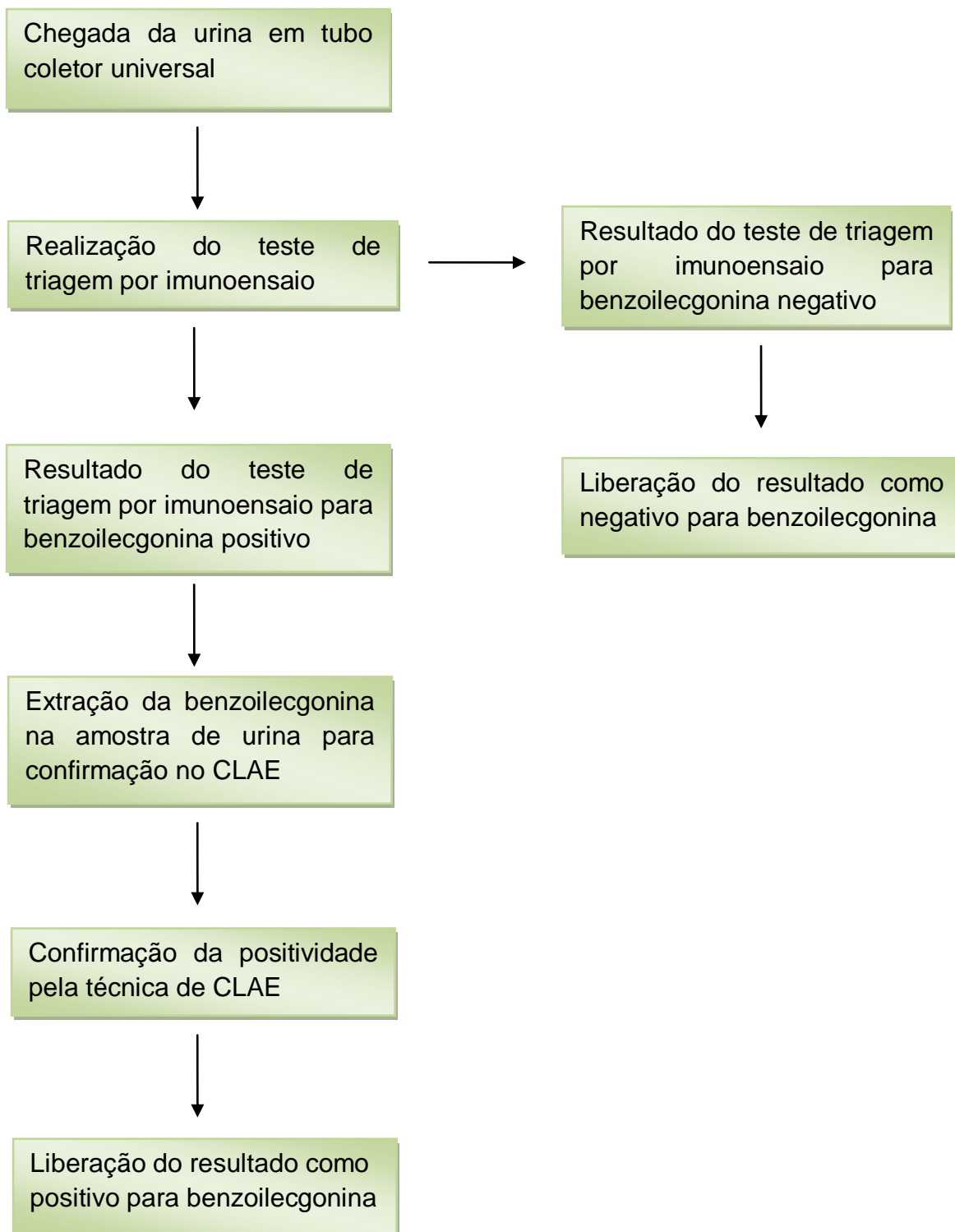
Foram tomadas 8 amostras de urinas, em torno de 30 mL cada, pré-analisadas por imunoensaio e identificadas como negativas. As 8 amostras foram todas colocadas em um erlenmeyer de 250 mL, posteriormente foram preparadas 6 amostra de 10 mL com concentrações conhecidas e variadas, de 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL e 80 µg/mL.

As amostras foram submetidas ao teste de triagem em tira por imunoensaio, onde após a realização do teste foi realizada a extração para confirmação de benzoilecgonina por CLAE, seguindo a metodologia apresentada anteriormente.

Após o procedimento extrativo, efetivou-se a análise das amostras pela técnica de confirmação da presença do metabolito da cocaína em cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.



### 3.5 Fluxograma para análise de urina



## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Teste de triagem por imunoensaio**

As amostras de 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL e 80 µg/mL foram todas positivas, pois na fita de triagem apareceu coloração apenas na marca controle. Já na amostra branco o resultado do teste foi negativo, portanto surgiu o aparecimento de coloração na marca controle como também na marca teste, ou seja, a concentração de benzoilecgonina está abaixo do nível detectado (300 ng/mL).

### **4.2 Teste de confirmação da presença de benzoilecgonina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)**

#### **4.2.1 Seleção da fase móvel**

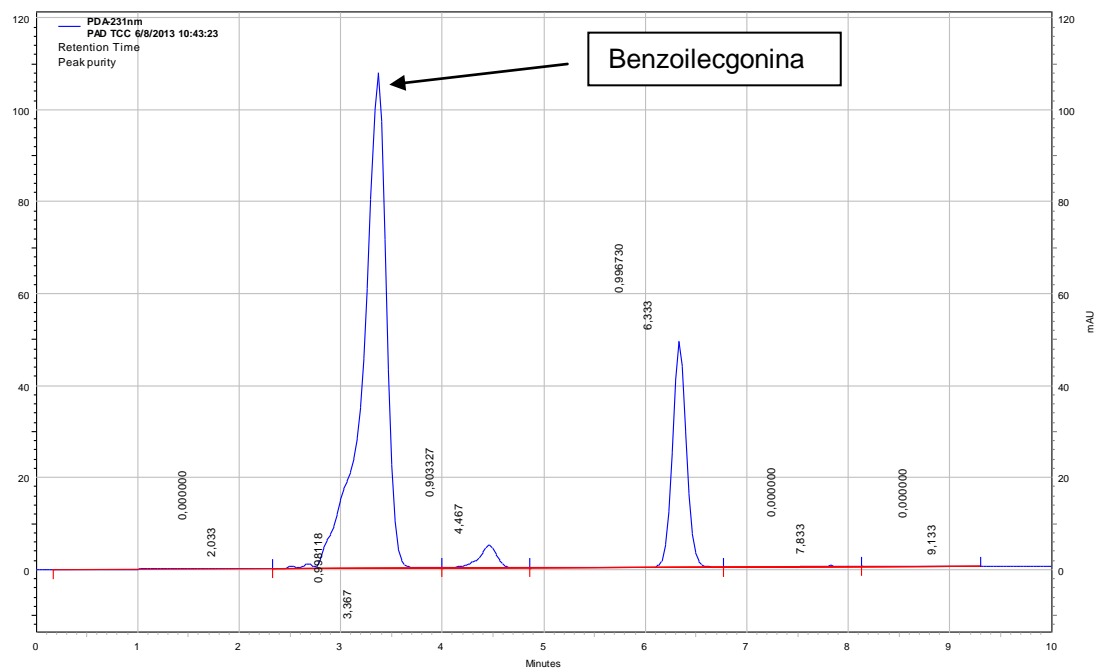
Para as medições cromatográficas efetuadas neste trabalho, foi escolhida como fase móvel fosfato: acetonitrila com pH 2,3 na proporção de 63:37 (v/v) de tampão. Valores otimizados com um tempo de retenção de 3.2 min.

#### **4.2.2 Seleção do comprimento de onda**

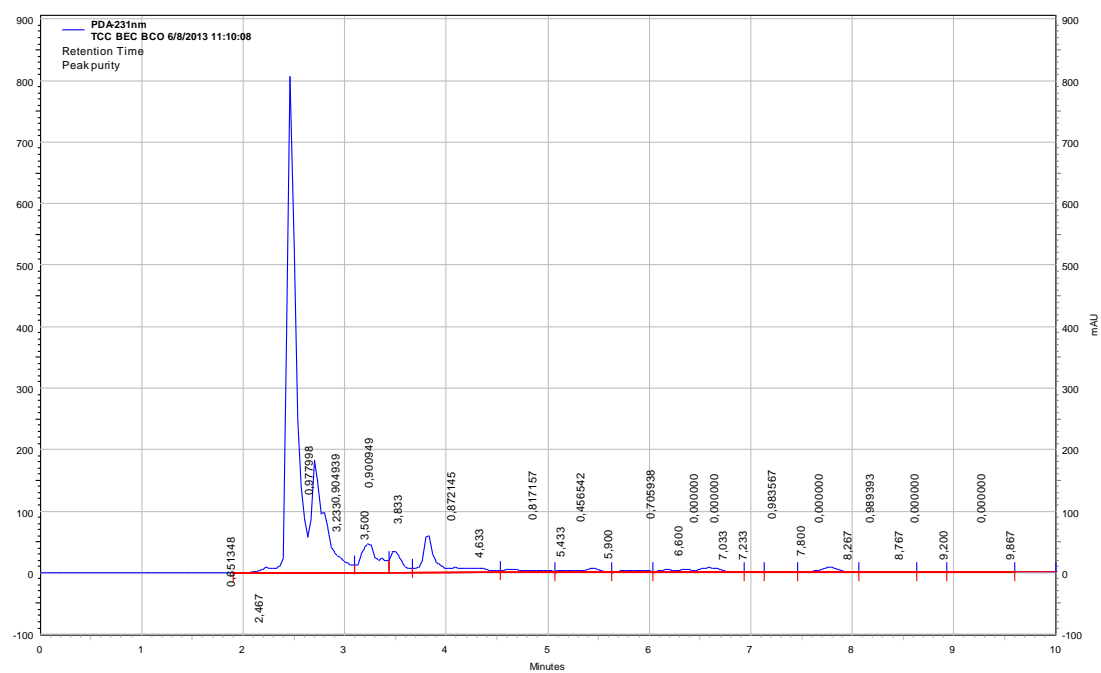
Os valores de absorbância foram medidos em comprimento de onda igual a 224 nm, dado ser este o comprimento de onda com máximo de absorção encontrado para a molécula de BE neste experimento.

## 4.2.3 Cromatogramas

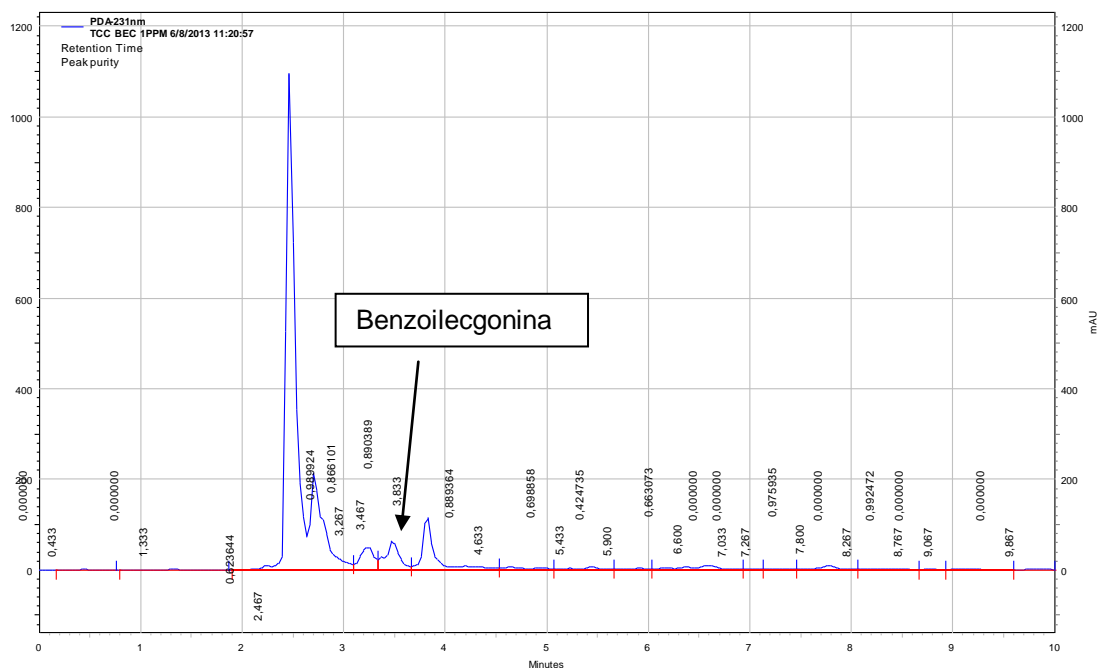
### Padrão de benzoilecgonina



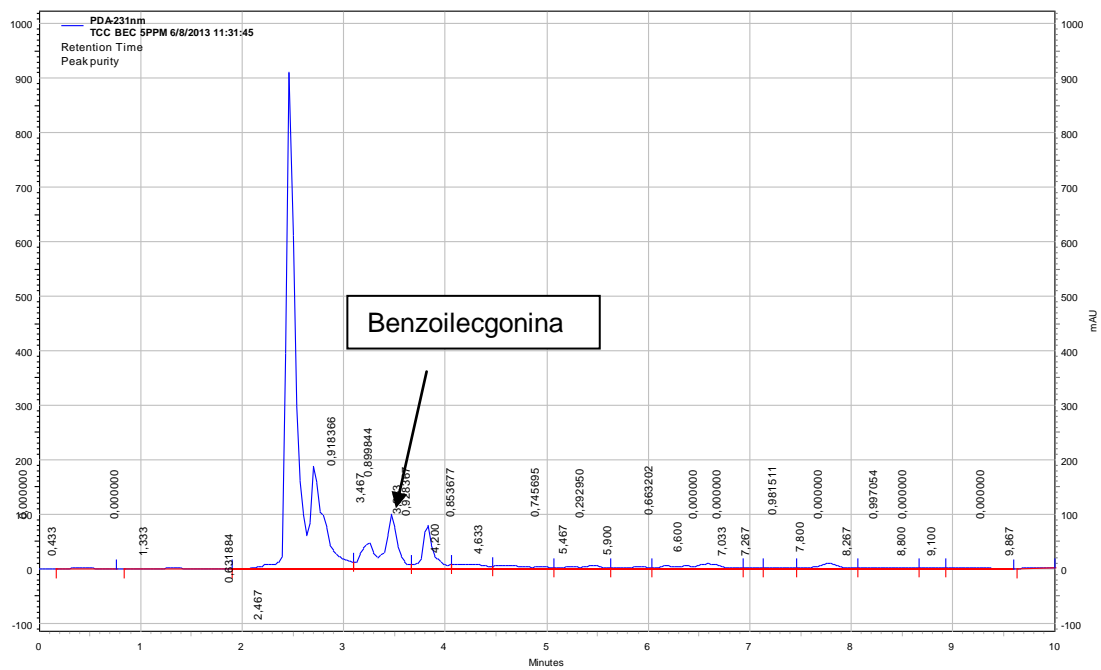
### Branco



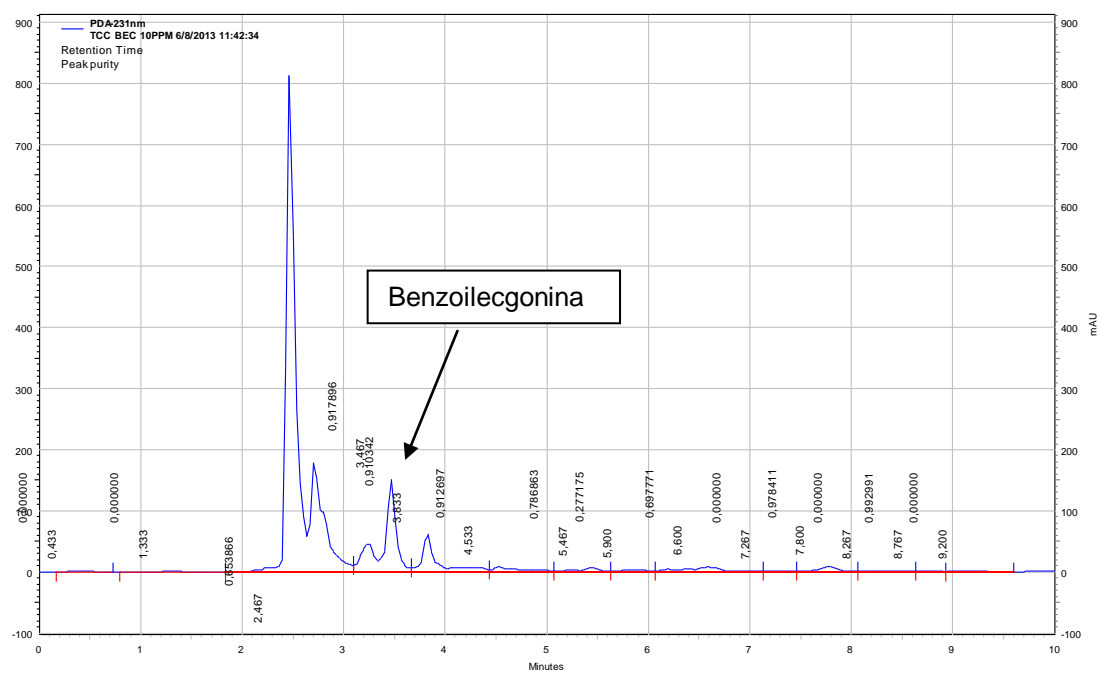
1  $\mu\text{g/mL}$



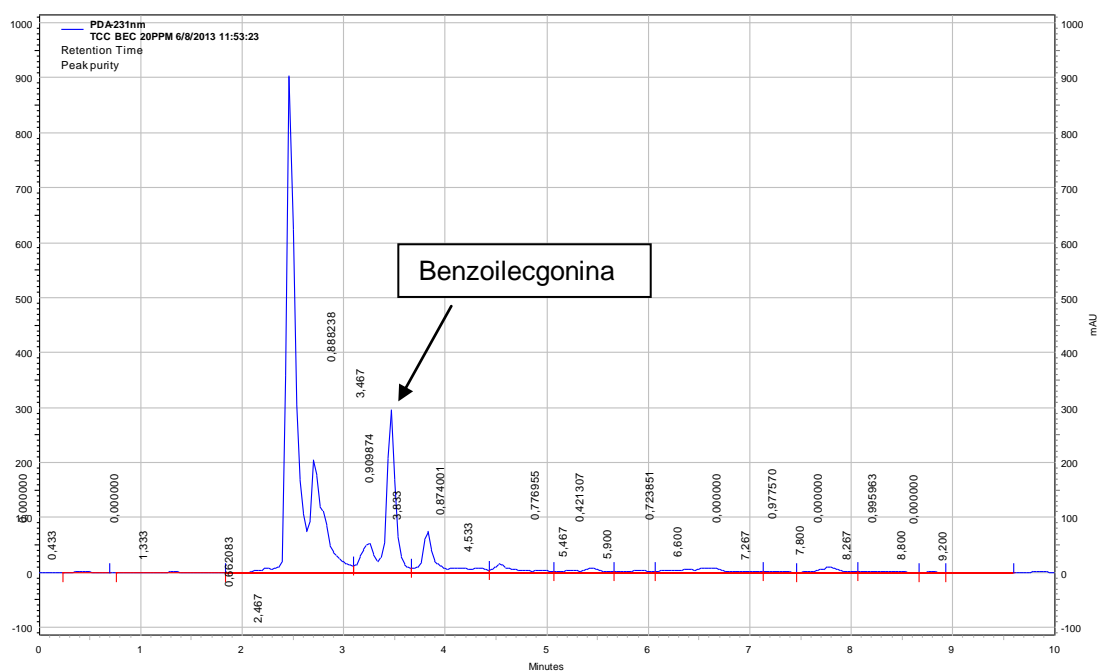
**5 µg/mL**



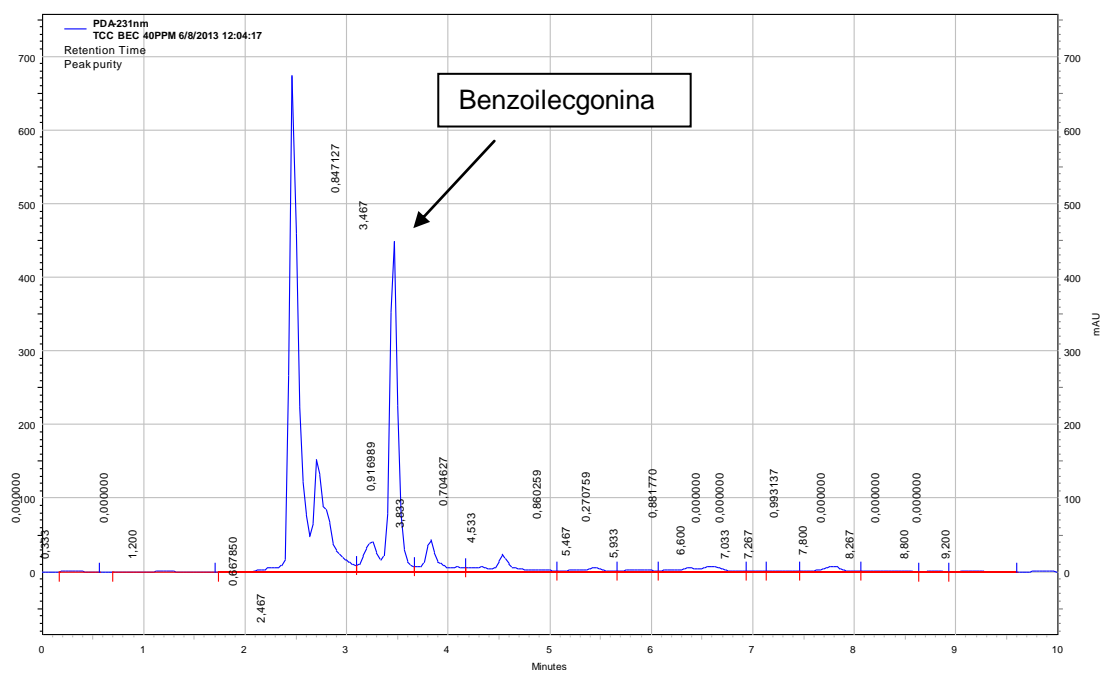
10 µg/mL



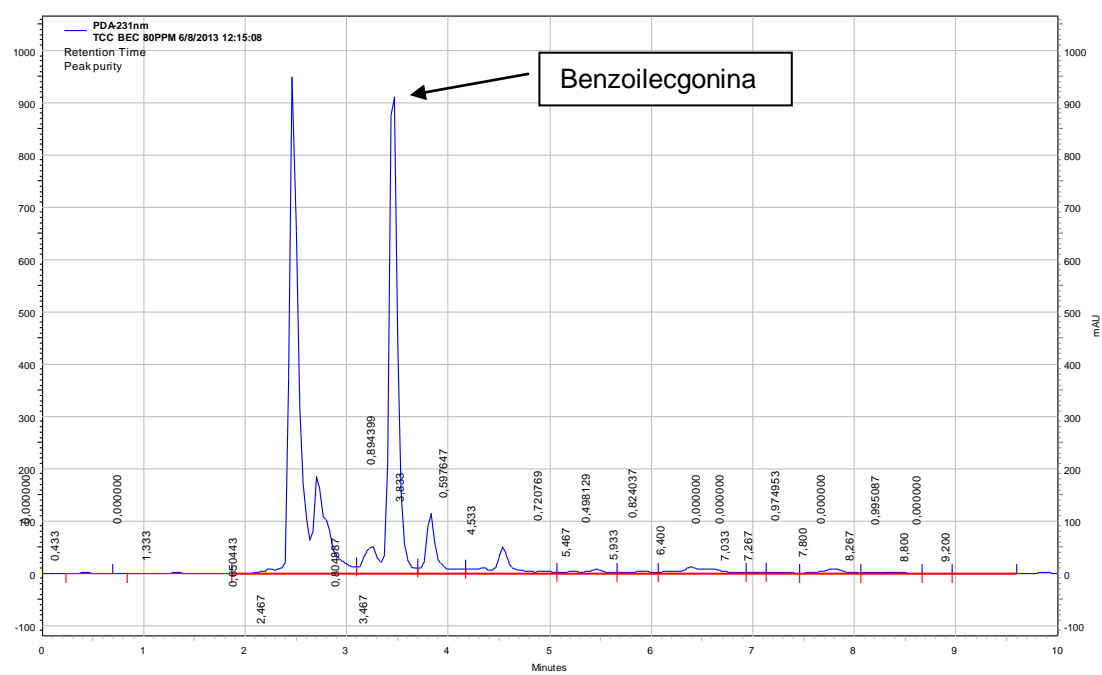
20 µg/mL



**40 µg/mL**



80 µg/mL



## 5 DISCUSSÃO

Nos ensaios de análises toxicológicas, a urina, após o humor vítreo, apresenta aproximadamente 98% de água em sua constituição, e é a matriz biológica com menor número de interferentes endógenos. Ela só irá apresentar níveis significantes de proteína e lipídio durante estados patológicos do indivíduo. Além disso, quando comparada ao sangue, frequentemente apresenta concentrações mais altas de xenobióticos e/ou de seus produtos de biotransformação. Desta forma apresenta-se como a amostra biológica ideal para extração e identificação de drogas (BULCÃO *et al.*, 2012).

As drogas são geralmente metabolizadas pelo fígado e eliminadas pela urina. A matriz biológica (urina) é aceita como amostra para verificação do uso recente de drogas de abuso, mas não permite distinguir o usuário ocasional do abusivo ou do dependente. Portanto, para analisar a urina em busca de metabólitos das drogas, necessitam-se inicialmente de um teste de triagem como os imunocromatográficos rápidos (MOREAU; SIQUEIRA, 2008). Esses testes são bastante empregados para avaliação do uso de drogas (FLECK *et al.*, 2008).

Esses testes são realizados de forma rápida e com sensibilidade adequada. Em um estudo realizado por FLECK *et al.*, 2008 foram encontradas doze marcas diferentes para realização de testes imunocromatográficos para as substâncias de interesse. Verificou-se que todos os testes avaliados possuem registro na ANVISA e apresentam-se sob a forma de painel (multidrogas), *strip* (tiras) ou cassete. A sensibilidade dos testes é a mesma em todas as marcas (50 ng/mL para maconha e seus metabólitos, e, 300 ng/mL para cocaína e metabólitos), excetuando uma das marcas (ACON®) que revelou ter seu nível de detecção menor que dos demais testes para cocaína e metabólitos (150 ng/mL). A especificidade dos testes é equivalente, no entanto, o número de substâncias testadas como interferentes é variado (FLECK *et al.*, 2008).

No teste de triagem por imunoensaio realizado nesse estudo, produzido pela indústria Inlab Diagnostica, para detecção de cocaína e seu metabolito, a benzoilecgonina, foi bem eficiente, baseado nos resultados obtidos, o qual permitiu detectar desde as concentrações mais baixa (1 µg/mL) até a mais elevada testada (80 µg/mL) sofrendo apenas uma variação na intensidade da cor na área teste da tira reativa.

Todas as amostras de urinas são amostras são pré-analisadas através do teste de triagem e com ausência de BE. As amostras foram todas colocadas em um erlenmeyer de 250 mL para verificação se a extração foi concretizada com eficiência, pois as amostras de urina são de organismos diferentes e todos os organismos possuem seu metabolismo próprio.

Na análise de confirmação do metabolito por CLAE os resultados atenderam o esperado, onde se conseguiu detectar a presença de benzoilecgonina em todas as amostras analisadas com exceção da amostra branca, semelhante aos resultados obtidos por Janicka *et al.*, 2010.

Nos resultados obtidos no cromatograma da amostra branca obteve-se um pico com um tempo de retenção de 3,500 min com uma intensidade semelhante ao pico de concentração de 1 µg/mL, que obteve um com um tempo de retenção de 3,467min. Sabe que o pico da amostra branca com tempo de retenção de 3,500 min não é referente à BE, pois com o aumento da concentração de BE o pico permanece intacto, aumentando apenas a intensidade de pico que apresenta tempo de retenção de 3,467 min.

A presença do metabólito da cocaína possui confirmação com a obtenção de picos bem definidos com um tempo de retenção de 3,467 min em todas as amostras, como mostrado pelos Cromatogramas. Em estudo realizado por Oliveira *et al*, 2009, os autores mostraram que o pico referente ao metabólito benzoilecgonina apresentou tempo de retenção próximo a 3.5 min, semelhante aos resultados obtidos no presente estudo.

A pureza dos picos obtidos nas amostras foi variada. A amostra de concentração de 1µg/mL apresentou uma pureza de 0,8661, a de concentração



de 5 µg/mL foi de 0,9183, para as concentrações de 10, 20, 40 e 80 µg/mL as purezas dos picos foram de 0,9178; 0,8882; 0,8471 e 0,8048 respectivamente, em um intervalo de 195 a 350 nm, onde estes resultados estão coerentes com o perfil químico observado para estas espécies. A pureza dos picos foi bastante satisfatória, pois em todas as amostras foram obtidas pureza superior a 0,800, e, em outras, como a amostra com concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL, conseguiu-se uma pureza de pico acima de 0,9000.

O padrão de BE é um padrão secundário, obtido através da hidrólise da cocaína. No cromatograma do padrão obteve-se um pico com tempo de retenção de 3,367 min e uma pureza de pico de 0,9981 em um intervalo de 195 a 350 nm.

Comparando-se o tempo de retenção do padrão com o tempo de retenção das amostras, ocorreu variação de 0,100 min que corresponde a uma variação de 2,9411% ou 97,0588% de proximidade, não apresentando grandes diferenças, pois essa variação não excedeu 5% e o percentual de proximidade não foi inferior a 95% (MACHADO *et al.*, 2009).

Tal variação, possivelmente ocorrida por conta da solução diluente da amostra padrão, neste caso metanol, enquanto as amostras testadas foram diluídas na fase móvel, uma preparação na proporção de 63:37 (v/v) de tampão fosfato: acetonitrila em pH 2,3. Não foi possível diluir o padrão na fase móvel, pois ele já estava pronto para análise.

Considerando-se um período de 10 min para uma análise completa da solução de amostra de urina sem efeitos de sobreposição, é possível estimar uma frequência analítica de 6 análises por hora, ou 48 análises por dia, considerando-se somente período comercial de 8 horas diárias. Neste contexto, tal metodologia atende perfeitamente a demanda local para estas análises, conforme informações coletadas no laboratório de toxicologia forense do IPC do município de João Pessoa.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As técnicas empregadas pelo instituto de polícia científica (IPC) da cidade de João Pessoa, as quais são: o imunoensaio e a cromatográfica líquida de alta eficiência, apresentadas neste trabalho para a análise do teor de cocaína em indivíduos vitimados por armas de fogo, apresentou boa sensibilidade, mostrando precisão e resultados satisfatórios, no tocante aos processos extrativos e de detecção de benzoilecgonina em urina de usuários de cocaína e derivados como o crack. Desta forma estas técnicas são de grande utilidade podendo ajudar a polícia a esclarecer a causa da morte de indivíduos vitimados por armas de fogo.

## 7 REFERÊNCIAS

- AMBRE, J.J. The urinary excretion of cocaine and metabolite in humans. A kinetic analysis of published data. *Anal. Toxicol.* 9:241-245, 1985.
- BAHS, F.C.; BAHLS S.C. Cocaína: origens, passado e presente. *Interação em Psicologia*, 6(2): 177-181, 2002.
- BULCÃO, R; GARCIA, S.C.; LIMBERGER, R. P.; BAIERLE, M.ARBO, M.D. CHASIN, A. A. M.; THIESEN, F.V.; TAVARES, R. Designer Drugs: aspectos analíticos e biológicos. *Quim. Nova*, 35(1): 149-158, 2012.
- CHASIN, A.A.M.; SILVA, E.S.; CARVALHO, V.M.\_In: *Fundamentos de Toxicologia*, 3ª Edição, São Paulo Editora: Atheneu, 2008.
- CHASIN, A. A M.; LIMA, I.V. Alguns Aspectos Históricos do Uso da coca e da cocaína. *Rev. Intertox. Toxicol. Risco Ambiental Soc.*, 1(1): 33-44, 2008.
- DEL-CAMPO ERA. Exame e levantamento técnico pericial de locais de interesse à Justiça criminal: abordagem descritiva e crítica. 2008. 276 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Direito da USP. São Paulo, 2008.
- DRUMMER, O.H. Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. *Anal Bioanal Chem.* 388(7): 1495-1503, 2007.
- FLECK, C.; LEITE, C.E.; SUSIN, N. OLIVEIRA, M. S. FLAVIA THIESEN, V. TRIAGEM DE MACONHA E COCAÍNA EM URINA ATRAVÉS DE IMUNOCROMATOGRAFIA. X Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2008.
- FERREIRA, P.E.M.; MARTINI, R.K. Cocaína: lendas, história e abuso. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, 23(2):96-99, 2001.
- HAWKS, RL. CN CHIANG. Urine Testing for Drugs of Abuse. National Institute for Drug Abuse (NIDA), Research Monograph 73, 1986.

JANICKA, M.; KOT-WASIK, A.; NAMIES'NIK, J. Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. *Trends Anal. Chem.*, 29(3):209-224, 2010.

KARCH SB. Cocaine: history, use, abuse. *J R SocMed*92 (8):393-397,1999.

KISZKA,M.; MADRO, R. Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin; EVALUATION OF THE METHOD OF COCAINE AND BENZOYLECGONINE ISOLATION FROM POST-MORTEM MATERIAL. PART I: LIQUID-LIQUID EXTRACTION; 2001.

KLAASSEN, C. D.; CASARETT AND DOULL'S Toxicology: the basic science of poisons,8th ed., McGraw-Hill: New York, 2012.

MOREAU, R. L. DE M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica, Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.

Machado, N. D. A; Cristina, M. D. C. V; Bittencourt, J. D. A. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISE – UM EXPERIMENTO DE FÁCIL APLICAÇÃO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E OS PRINCÍPIOS DA “QUÍMICAVERDE” NA DETERMINAÇÃO DE METILXANTINAS EM BEBIDAS. *Quim.Nova*, Vol. 32, No. 9, 2476-2481, 2009.

PRAGST, F; HERZLER, M; ERXLEBEN, B.-T. Systematic toxicological analysis by high performance liquid chromatography with die de array detection (HPLC–DAD). *Clin. Chem. Lab. Med.* 42:1325–1340, 2004.

OLIVEIRA, L.G.; NAPPO, S.A. Crack na cidade de São Paulo: acessibilidade, estratégias de mercado e formas de uso. *Rev. Psiquiatr. Clín.* 35(6): 212-218, 2008.

OLIVEIRA, M.F.; ALVES, J.Q.; ANDRADE, J.F.; SACZK, A.A.; OKUMURA L.L. Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis. *Ecl. Quím.*, São Paulo, 34(3): 77 - 83, 2009.

SILVA, M.I.G. CITÓ, M.C.O. VASCONCELOS, P.F. VASCONCELOS, S.M.M. SOUSA, F.C.F. - Cocaína – história, ações neurobiológicas do vício e recaídas e perspectivas. Acta Med Port.; 23(2): 247-258, 2010.

Silva, O.A; ODO, S.A., Toxicologia da cocaína, in: LEITE, M.C; ANDRADE, A.G. Cocaína e crack. Porto Alegre. Artmed, 1999, p (88-95)

SKOOG DA; HOLLER FJ; NIEMAN TA; Princípios de análise instrumental. 5ª. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

UNODC - WORLD DRUG REPORT: Disponível em: [http://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World\\_Drug\\_Report\\_2013.pdf](http://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World_Drug_Report_2013.pdf). Acesso: 13 de julho de 2013.

VOGEL AI. Química Analítica Qualitativa. 5ª Ed. (1981). São Paulo: Mestre Jou, Reimpressão em 2005.